基础研究

两种扩增仪对联合毛细管电泳技术的聚合酶链式反应的影响

吴小芳，陆建林
顺德职业技术学院，广东 佛山 528000

摘要：目的 使用两种扩增仪进行常规扩增和毛细管电泳，观察两种扩增仪对结果的影响以及有何不同。**方法** 运用PowerPlex试剂盒对DNA在Applied Biosystems 9700和Hema 9700两种扩增仪上进行扩增，扩增包括对血卡进行直接扩增和对提取后的DNA进行扩增，然后在Applied Biosystems 3130XL上进行毛细管电泳检测；使用同一DNA进行5次重复试验进行扩增仪的稳定性检测；使用7种非人样本DNA进行种属特异性检测；运用不同稀释度的2800阳性标准品进行灵敏度检测；对使用两种扩增仪扩增检测后的所有结果进行分析、讨论和评价。**结果** 使用两种扩增仪进行扩增检测后，其分型结果在两种扩增仪之间没有明显差别，其分型结果均稳定准确且在两种扩增仪上呈现一致性，种属特异性检测结果一致，灵敏度检测结果一致。**结论** 两种扩增仪在进行常规扩增检测时，其结果在两种扩增仪之间没有明显差别，其结果呈现出一致性，两种扩增仪均可应用于常规扩增。

关键词：扩增仪；聚合酶链式反应；毛细管电泳；分型

Effect of the polymerase chain reaction combined capillary electrophoresis on two amplification instruments

WU Xiaofang, LU Jianlin
Medical Colledge, Shunde Polytechnic, Foshan 528000, China

Abstract: Objective To observe the effects and differences between the two amplification instruments combined capillary electrophoresis. **Methods** DNA extracted were amplified with the optimized PCR method and cycling protocol using Powerplex 21 kit on the Applied Biosystems 9700 and HEMA 9700 instrument, including direct amplification and DNA amplification, and then genotyped using Applied Biosystems 3130xl. Same DNA test was repeated five times to test the stability of the instrument, seven kinds of non-human DNA samples were detected and 9947 was used as positive standard to test the sensitivity. Then genotyping results were validated and discussed. **Results** Genotyping results between the two instruments had no significant differences, genotyping results were stable and accurate and showed consistency in species-specific detection and sensitivity detection between the two amplification instruments. **Conclusions** There is no significant difference between the two amplification instruments of the routine amplification test and the results were consistent. The results showed that the two amplification instruments could be used in routine amplification.

Key words: amplification instrument; polymerase chain reaction; capillary electrophoresis; typing

聚合酶链式反应是一种用于放大扩增特定的DNA片段的分子生物学技术，聚合酶连反应（PCR）技术可看作是生物体外的特殊DNA复制，能将微量的DNA大幅增加[1]。目前，常规检测步骤包括DNA提取、定量、复合STR扩增、电泳检测等已经成为广大实验室的常规实验，使用PCR扩增仪进行复合STR扩增则是其中至关重要的一步[2]，而PCR仪器的发展中PCR温度循环至关重要，PCR扩增仪各参数必须准确无误，DNA聚合酶以及快速升/降温速率的PCR扩增仪[3]的出现，使快速PCR技术在各科研实验中实现大规模应用成为可能。国内许多研究文献均局限于旧式的PCR扩增仪，随着科技的发展，新型的PCR扩增仪层出不穷，国内外多家公司均有推出不同类型的PCR扩增仪，而国内外不同扩增仪之间结果有何不同的相关研究却很局限，所以本文针对在国内外具有代表性的Applied Biosystems 公司的9700 PCR扩增仪和黑马公司的Hema 9700PCR扩增仪进行扩增检测，通过血卡直接扩增[4-6]和DNA扩增，对两种扩增仪的检测结果进行比对来评估不同扩增仪对最终分型结果的影响。

收稿日期：2016-09-15
作者简介：吴小芳，硕士，助教，E-mail: 670313991@qq.com
通信作者：陆建林，硕士，副教授，E-mail: 184778962@qq.com

1 材料与方法

1.1 实验样本

志愿者静脉血卡60份，类人猿、猴、羊、猪、兔、鼠、狗的DNA各2份[7-8]，样本DNA 50份。

1.2 主要试剂和仪器

PowerPlex® 21试剂盒[9]（Promega，美国），ABI 9700扩增仪（Applied Biosystems，美国），Hema 9700扩增仪（珠海黑马医学仪器有限公司，中国）ABI 3130XL遗传分析仪（Applied Biosystems，美国）。

1.3 方法

1.3.1 DNA扩增 PowerPlex® 21扩增体系：Master Mix 5 μL，Primer Mix 5 μL，灭菌水13 μL，模板DNA2 μL。扩增程序：96 ℃ 1 min，94 ℃ 10 s，59 ℃ 1 min，72 ℃ 30 s，30个循环；60 ℃延伸10 min；25 ℃保存[10]。

1.3.2 直接扩增 PowerPlex® 21扩增体系：Master Mix 5 μL，Primer Mix 5 μL，灭菌水15 μL，0.5 mm血卡。扩增程序：72 ℃ 20 min，96 ℃ 1 min，94 ℃ 10 s，59 ℃ 1 min，72 ℃ 30 s，30个循环；60 ℃延伸10 min；25 ℃保存[10]。

1.3.3 稳定性扩增 同一份DNA（编号D7）参照DNA扩增的扩增体系和扩增程序重复扩增5次，同1份血卡（编号F3）参照直接扩增的扩增体系和扩增程序重复直接扩增5次[11]。

1.3.4 种属特异性扩增 使用类人猿、猴、羊、猪、兔、鼠、狗的DNA参照DNA扩增的扩增体系和扩增程序进行扩增。

1.3.5 灵敏度扩增 使用浓度分别为1、0.75、0.5、0.25、0.125、0.063、0.032 ng/μL[12]的2800样本参照DNA扩增的扩增体系和扩增程序进行扩增。

1.3.6 电泳检测 扩增后使用ABI 3130XL型分析仪进行检测，电泳检测时，PowerPlex® 21试剂盒上样混合物为10 μL甲酰胺和2 μL ILS500混匀为12 μL，加入1 μL扩增产物或ladder，具体操作参照PowerPlex® 21试剂盒使用说明。

1.3.7 数据分析 所得DNA检测图谱获得13个基因座以上正确分型且各等位基因峰高高于50RFUs为有效分型[13-14]，重复试验结果按照同一基因座出现该峰2次以上的统计学原则进行统计分析[15]。

2 实验结果

2.1 DNA扩增

对50份样本DNA使用PowerPlex® 21的标准扩增体系和扩增程序进行扩增，然后使用3130XL测序仪进行检测，共获得1534个STR等位基因，所有DNA在两台扩增仪扩增后均获得良好分型结果，准确性均为100%，同一份样品扩增检测后，其峰高和峰面积在两台扩增仪间无明显差异（图1）。

2.2 直接扩增

对60份志愿者静脉血卡使用PowerPlex® 21的标准扩增体系和扩增程序进行直接扩增，然后使用3130XL测序仪进行检测，共获得1875个STR等位基因，所有血卡在两台扩增仪扩增后均获得良好均衡的分型结果，准确性均为100%，同一份样品扩增检测后，其峰高和峰面积在两台扩增仪间无明显差异（图2）。

2.3 稳定性检测

使用PowerPlex® 21的标准扩增体系和扩增程序对同一份DNA（编号D7）重复扩增5次，然后使用3130XL测序仪进行检测，其峰高峰面积在两台扩增仪间无明显差异；使用PowerPlex® 21的标准扩增体系和扩增程序对同一份血卡（编号F3）重复直接扩增5次，然后使用3130XL测序仪进行检测，其峰高峰面积在两台扩增仪间无明显差异。

2.4 种属特异性检测

使用PowerPlex® 21的标准扩增体系和扩增程序对类人猿、猴、羊、猪、兔、鼠、狗7种非人DNA样本进行扩增，然后使用3130XL测序仪进行检测，检测结果显示，在ABI 9700扩增仪扩增后，类人猿检测出9个片段，其中2个片段在等位基因bin上。猴和猪分别均检测出1个等位基因片段，均不在等位基因bin上。羊、鼠、兔和狗的样本均未检测出特异性分型；在Hema 9700扩增仪扩增后，类人猿检测出11个片段，其中3个片段在等位基因bin上。羊、猴和猪分别均检测出1、2和1个等位基因片段，均不在等位基因bin上。鼠、兔和狗的样本均未检测出特异性分型。

2.5 灵敏度检测

使用PowerPlex® 21的标准扩增体系和扩增程序对1、0.75、0.5、0.25、0.125、0.063、0.032 ng/μL的2800阳性标准品进行扩增，然后使用3130XL测序仪进行检测，ABI 9700扩增仪和Hema扩增仪扩增后检测结果均显示样品浓度达到或超过0.063 ng/μL时可以获得完整分型结果且各等位基因峰高高于50RFUs，0.063 ng/μL的2800阳性标准品检测结果显示，在D3S1358位点出现非特异扩增，在D2S1338位点、D19S433位点和Penta D位点出现等位基因丢失现象，0.032 ng/μL的2800阳性标准品检测结果显示，在D3S1358位点出现非特异扩增，在D2S1338位点、D19S433位点、Penta D位点、Penta E位点、D8S1179位点和TPOX位点出现等位基因丢失现象，且相同浓度的阳性标准品2800扩增检测后，其峰高在两台扩增仪间无明显差异（图3）。

3 讨论

本实验通过使用PowerPlex® 21试剂盒在Applied Biosystems 9700和Hema 9700两种扩增仪上进行扩增，通过DNA扩增、血卡直接扩增、稳定性检测、种属特异性检测和灵敏度检测等发现两台扩增仪在扩增效力上没有明显差异，其峰高和峰面积呈现极大的一致性。

ABI 9700扩增仪外观为蓝色液晶大屏幕显示屏，PCR编程及运行过程简便直观，升降温速率为3.5 ℃/s，

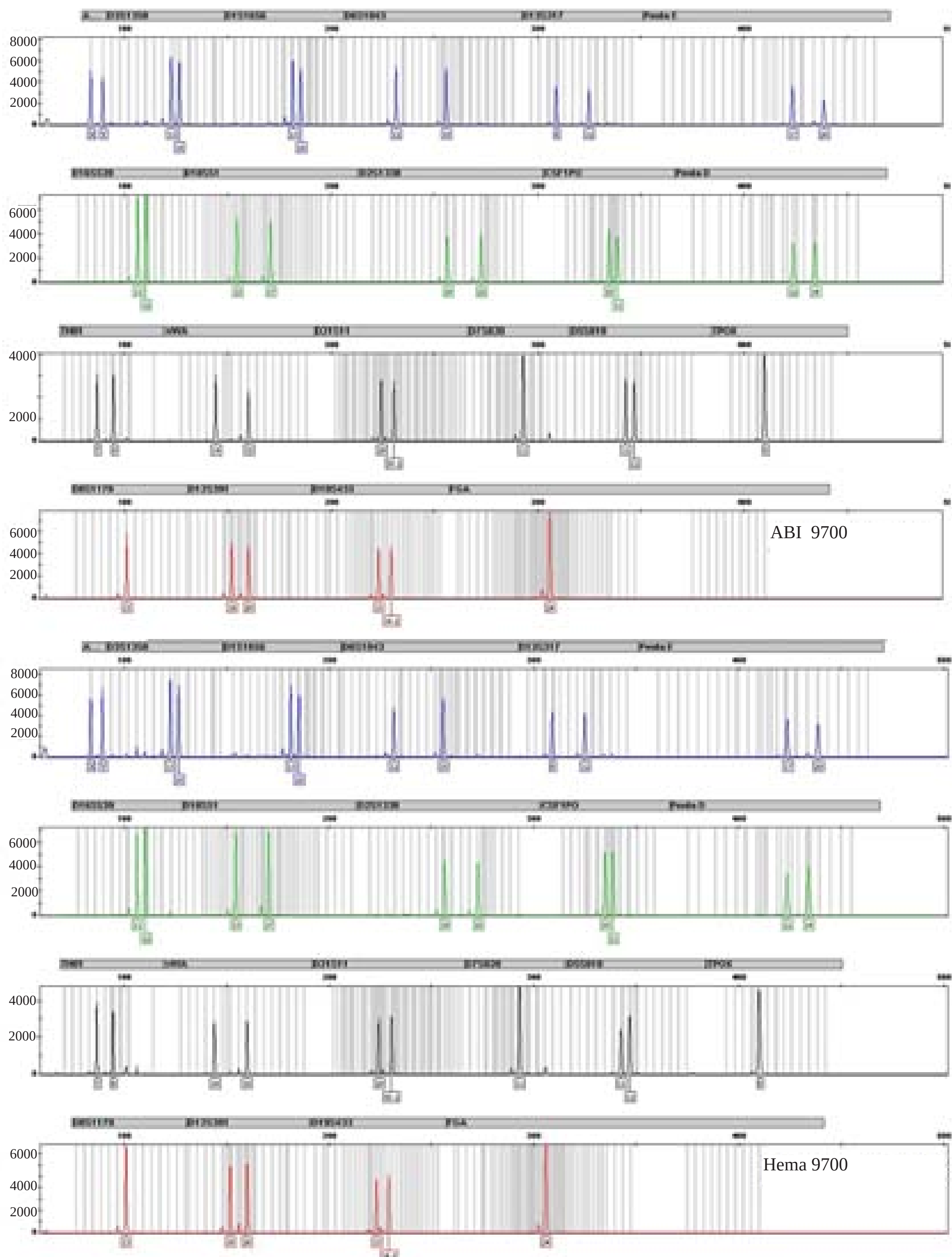


图1 两台扩增仪上DNA PowerPlex® 21扩增分型结果

一个主机可配多种不同类型的样品基座，调换方便简单，检出率高，适用于常规扩增，与3130XL等常规测序仪相适用，并且携带自动断电保护，恢复供电后自动执行未完成程序。Hema9700扩增仪外观为高清晰超大5.7寸彩色大屏幕中文LCD，用户界面的扩增过程相关参数和图表显示更直观，编程简单快捷，升温速率≥4.0 ℃/S，降温速率≥3.5 ℃/S，标准模块是：(96×0.2+77×0.5) mL混合模块；可另选384well模块；模块更换方便、快捷，检出率高，适用于常规扩增，与3130XL等常规测序仪相适用，具有断电记忆功能和时间递增/递减功能，适合长链基因(450 nm以上)的扩增，具有温度递增/递减功能，适合科研需求，从我们常规使用来看，Hema 9700扩增仪更具备经济实用的特点，界面为中文操作，更符合实验员语言需求，屏幕较大，观察也更为便捷等。

从DNA扩增结果和血卡直接扩增结果来看，ABI 9700扩增后的检测结果与Hema9700扩增后的检测结果没有明显差异，检测的图谱中均没有位点丢失现象，其峰高在不同位点呈现一致性。稳定性检测结果显示，

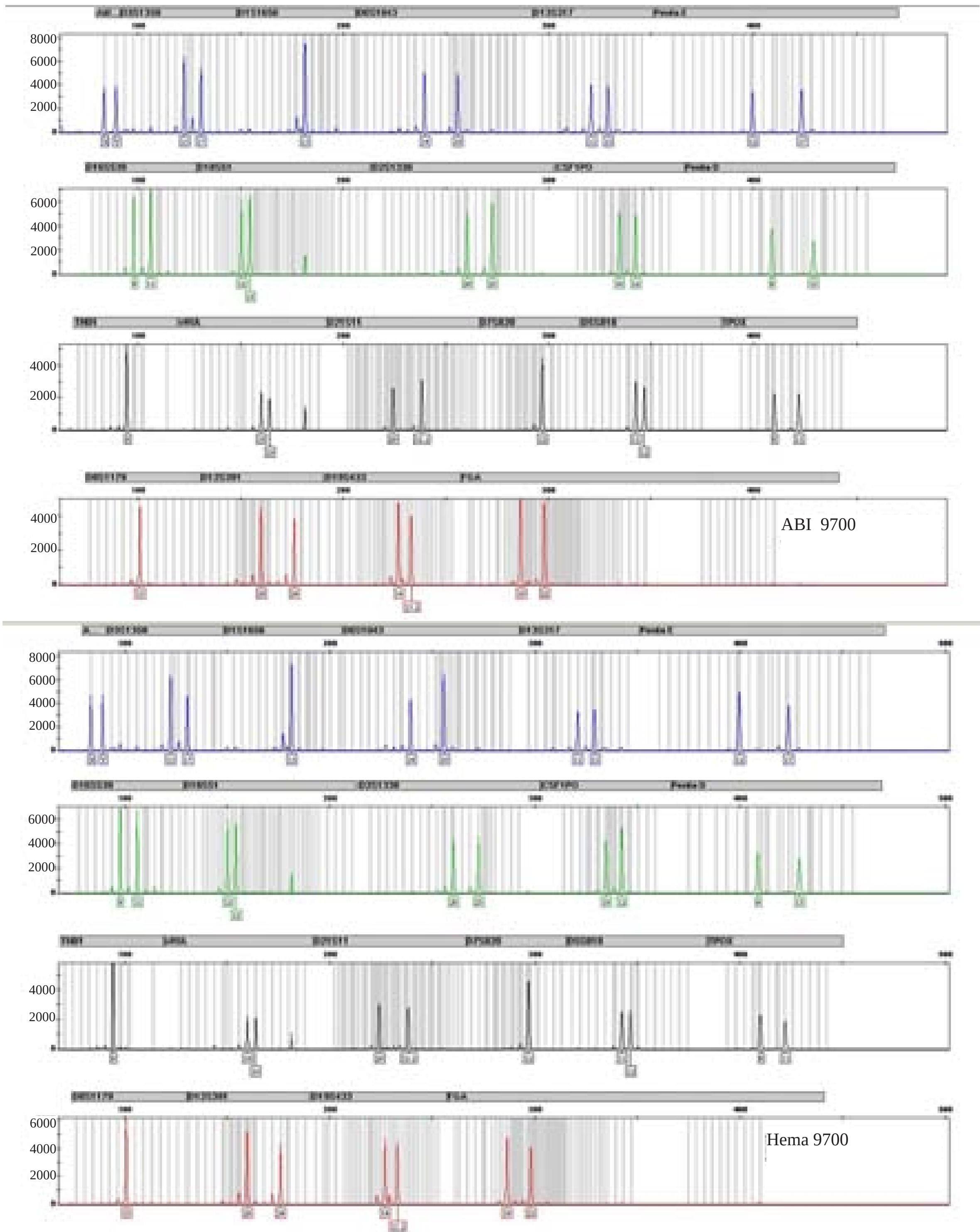


图2 两台扩增仪上血卡PowerPlex® 21直接扩增分型结果

ABI 9700扩增后的检测结果与Hema 9700扩增后的检测结果没有明显差异，其分型峰高在两台扩增仪和5次扩增中没有明显差异，在不同位点呈现一致性。

种属特异性检测结果显示，两台扩增仪在扩增同样的非人DNA样本时，其分型结果呈现一致性，ABI 9700与Hema 9700扩增仪分别在类人猿DNA上检测出9个和11个片段，在羊DNA上分别检测出0和1个片段，在猴DNA上分别检测出1和2个片段，在猪DNA上均检测出1个片段，在鼠、兔和狗上均未检出任何片段，二者在检测到的片段上呈现一致性。灵敏度结果显示，在同一个浓度的2800下，ABI 9700扩增后的检测结果与Hema9700扩增后的检测结果没有明显差异，在不同浓度的2800上，两台扩增仪的检测结果呈现一致性，随着2800的浓度降低，分型峰高也逐渐降低，在2800浓度为0.032 ng/μL时开始出现丢点现象，两台扩增仪在丢点的位点上呈现一致性。

在马洪滨等[16]关于两种PCR扩增仪检测结果的比较中，两台扩增仪扩增后其检测结果没有明显差异，而

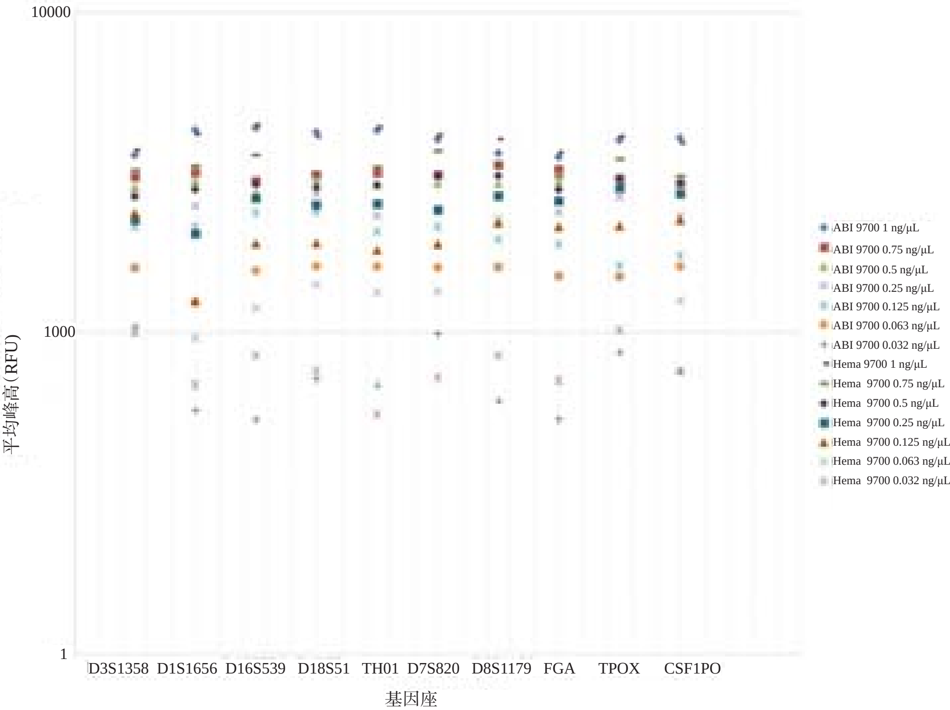


图3 不同浓度的2800在ABI9700和Hema9700扩增仪上的扩增分型结果平均峰高图

在汤春园等[17]关于两台不同厂家的PCR扩增仪的研究报告中,也有指出,不同PCR扩增仪进行扩增后,其检测结果并没有明显差异,在蒋明等[18]关于3种常见型号PCR扩增仪的研究报告中也指出,3台扩增仪扩增后其结果统计无显著统计学意义。这些既往研究结果与本文最终得出的研究结果是相一致的,使用国内外不同扩增仪进行扩增后检测,其结果并未有明显差异。结合外观、性能、DNA扩增、血卡直接扩增、稳定性检测、种属特异性检测和灵敏度检测结果综合考量,两台扩增仪扩增效果间无明显差异,两台扩增仪均可适用于常规扩增,可广泛应用于各实验室和科研院所。这一研究结果有助于广大实验室在选购扩增仪时提供重要参考依据,本研究结果也有助于实验人员在分析实验结果时,排除使用了不同扩增仪的问题,也有助于实验人员相互交流实验仪器的使用情况等。

参考文献:

[1] Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction[J]. Sci Am, 1990, 262(4): 64-5.
[2] Dennis YW, Chien WC, Hennessy LK. Rapid STR analysis of single source DNA samples in 2 h[J]. Forensic Sci Int , 2009, 2(9): 115-6.
[3] Verheij S, Harteveld J, Sijen T. A protocol for direct and rapid multiplex PCR amplification on forensically relevant samples[J]. Forensic Sci Int Genet, 2012, 6(9): 167-75.
[4] Mercier B, Gaucher C, Feugeas O, et al. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18 (19): 5908-12.
[5] 吴冠芸, 朱宁宁, 赵艳军, 等. 干血纸片直接扩增法的改进[J]. 中华医学遗传学杂志, 1994, 11(4): 236-7.
[6] 张 建, 姜成涛, 赵兴春, 等. DNATyperTM 15试剂盒直接扩增检验纸质样本的研究[J]. 刑事技术, 2011, 4(8): 33-5.
[7] 郭 宏, 李 丽, 杨 辰, 等. 动物DNA分析在法庭科学中的应用[J]. 中国司法鉴定, 2012,13(2): 69-71.
[8] 周 斌, 张 林, 吴梅筠, 等. DNA分析与种属鉴定[J]. 法医学杂志, 2003, 19(4): 245-8, 252.
[9] 任 贺, 刘 莹, 张庆霞, 等. PowerPlex 21与Goldeneye 20A试剂盒的一致性验证及法医学应用[J]. 法医学杂志, 2014, 30(3): 191-3.
[10] Vallone PM, Hill CR, Butler JM. Demonstration of rapid multiplex PCR amplification involving 16 genetic loci[J]. Forensic Sci Int Genet, 2008, 3(1): 42-5.
[11] Choung CM, Lee DS, Park KW, et al. Test of the rapid PCR method using AmpFLSTR Identifiler kit[J]. Forensic Sci Int, 2011, 3(10): e475-6.
[12] Tsukada K, Yutaharayama, Yoshinobukurasawa, et al. Fast PCR amplification AmpFLSTR Identifiler:Second report[J]. Forensic Sci Int ,2009, 2(6): 108-10.
[13] Butler JM. Forensic DNA Typing[M]. 2nd edition. New York: Elsevier, 2005: 51-2.
[14] Butler JM. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing[J]. Forensic Sci, 2006, 51(2): 253-65.
[15] 韩俊萍, 李彩霞, 严 红, 等. 低体积PCR扩增用于单细胞分离和检验[J]. 法医学杂志, 2012, 28(2): 123-5.
[16] 马洪滨, 刘立明, 李永利, 等. 两种荧光定量PCR扩增仪检测结果的比较[J]. 医疗卫生装备, 2012, 33(8): 112-3.
[17] 汤春园, 罗 毅, 李 山, 等. 两台不同厂家PCR扩增仪检测血清HBV-DNA低浓度标本的对比分析[J]. 广西医科大学学报, 2008, 25 (4): 556-7.
[18] 蒋 明, 周玉球, 李文典, 等. 三种常见型号PCR扩增仪的临床应用评价[J]. 中国医师杂志, 2002, 4(8): 893-5.